— SAITO AWARD LECTURE FOR 1989 —

A Practical Studies for Bovine Embryo Transfer

Hiddenari YAMASHINA

Tokachi Ikusei Bokujo, Hokkaido Agricultural Development Public Cooperation, 708 Oda, Taiki-Cho, Hiro-Gun, Hokkaido 089-22

Summary. Bovine embryos were transferred to 1340 recipients for a period of 7 years. The pregnancy rate obtained was 54.7% (716/1310). Some factors which led to an improved conception rate were investigated. These include checking of the corpus luteum (CL), the time of transfer to the recipients and the skill of the operator.

Export of frozen embryos to Korea was also attempted on an experimental basis from 1987 to 1988. The transfer of frozen-thawed embryos resulted in a conception rate of 61.4% which was better than the rate of 40% obtained in our farm.

Twinning of Japanese Black Cattle was also tried by the transfer of 2 embryos to Holstein-Friesian heifer recipients since 1987. The twinning rate obtained was 50%. The abortion rate for single uterine horn transfer was 20% and only 8% for bicornual transfer.

KEY WORDS: BOVINE ET. ON-FARM, FROZEN EMBRYO, TWINNING.

Jpn J Anim Reprod 35, 20P-24P, 1989

— 1989年度斎藤賞受賞講演 —

牛受精卵（胚）移植の応用的研究

山 科 秀 也

北海道農業開発公社十勝育成牧場 〒089-22 北海道広尾郡大樹町尾田708

序論—実用化に至る背景—

北海道農業開発公社十勝育成牧場における牛受精卵（胚）移植への取組みは、昭和56年1月に北海道大学の金川教授の指導によりホルスタイン種の乳用牛について行われたのが最初であり、同年10月に4頭の子牛が誕生した。この成功例をきっかけに、全道各地の酪農家より牛受精卵（胚）移植に関する問合せがあり、実用化への道を歩むことになった。

十勝育成牧場は、乳用育成牛900頭を飼養する牧場で、6～12ヵ月齢の若牛を購入し授精適期に人工授精を行い、受胎した牛は分娩の2～3ヵ月前に販売する、いわゆる「買取り育成」を行っている。人工授精の対象となる育

成牛を常時200頭以上保有しているので、1日の発情牛は10頭以上に達することになる。このように豊富な授精対象牛は、考え方を変えれば、豊富な受卵（胚）牛を有することとなり、牛受精卵（胚）移植を実用化するための最良の要因となっている。

材料と方法—十勝育成牧場方式—

十勝育成牧場では、地区の農業共済組合などの協力を得ると共に受卵（胚）牛の豊富さを生かして自然発情の未経産牛に移植を行っている。受胎牛は分娩の2ヵ月前に受精卵（胚）移植農家に販売しているが、料金は成功報酬方式で、技術料は無料となっているだけでなく、途中で流産した場合も無料である。販売時点で確実に妊娠

していることを確めて引渡し、受卵（胚）牛の価格に10万円をプラスしている。

乳牛の新鮮卵（胚）を中心に移植に取り組んでいるが、1984年より凍結卵（胚）の移植、さらに1986年には黒毛和種の2卵移植による双子生産にも取り組み、現在に至っている。

結果と考察—応用的研究—

1) 受胎率向上のための試み

十勝育成牧場では、1981年より1987年までの7年間に、1,310頭に移植を行い716頭の受胎例を得、受胎率は54.7%であった（Table 1）。この間、受胎率の向上を目的に、主として受卵（胚）牛側の要因に関する応用的研究を行った。1981年から1984年までの4年間の成績は、367頭中145頭が受胎し、受胎率は39.5%と低率であったので、種々のデーターの分析を行った結果、次のような重要なポイントが解明された。

受卵（胚）牛の黄体確認者数と受胎率：受卵（胚）牛の発情発見はスタンディング発情を基本としているが、移植直前に黄体確認を行い、左右いずれの子宮角に移植するかを決定している。黄体の状態を正確にチェックするために数人の技術者が直腸検査しがちであるが、数人が黄体確認を行った場合の成績は、108頭中31頭が受胎し、受胎率は28.7%と低率であったのに比べ、1人のみが直

腸検査を行った場合は、199頭中97頭の受胎が得られ、48.7%と高受胎率であった。（Table 2, 1981—1984）。したがって、受胎率を向上させるには、スタンディング発情を重視し、黄体確認は1人が素早く行う事が大切で、左右卵巣のいずれか確認する程度にすべきである。また、数人の直腸検査による黄体触診、特に直腸検査に慣れない技術者の乱暴な触診は黄体に何らかの悪影響を与え、受胎率が低下する事を示している。この他に、受精卵（胚）のランクやステージ、そして受卵（胚）牛の日差など9項目の問題点を検討する事により（Yamashina, 1984）、1985年からの3年間の成績は、943頭中571頭が受胎し、受胎率は60.6%と向上した。

移植に要する時間と受胎率：1985年から1986年にかけて移植器の腔内挿入から除去までの時間と受胎率の関係を検討した。移植器は、0.25 ml のフランス製スパイラル式（先穴）のカスーガンを使用、移植した卵（胚）は全て乳牛の新鮮卵（胚）で、回収後5時間から12時間以内に移植作業を完了した。試験期間中の受胎成績は403頭中239頭で受胎率は59.3%であった。移植時間と受胎率との検討の結果は、10分以内では277頭中179頭が受胎し、受胎率64.6%と高く、20分以内は78頭中43頭（55.1%）、30分以内は26頭中11頭（42.3%）および30分以上は22頭中6頭（27.3%）と、時間の経過に従って受胎率の低下する傾向がみられた（Table 3）。従来、頸管経由法による受精卵（胚）移植の際には、出血させないように出来るだけ慎重に移植する事に注意を払ってきたが、今回の結果から、迅速に移植を完了する事も、より良い受胎成績を得るためには大切な要因である事が明らかになった。

また、技術者による個人差では、最高78.4%から最低28.6%と技術や経験の差による受胎率のバラツキが見られた。この他に黄体のタイプとランク別の受胎率についても検討を行い、移植時における優先順位の参考とした。

2) 韓国における凍結卵（胚）移植試験

十勝育成牧場における凍結卵（胚）の成績：1984年より1988年までの5年間に218頭に移植を行い88頭が受胎し、受胎率は40.4%であった。一方、同時期の新鮮卵（胚）

Table 1. Annual conception rate by embryo transfer in Tokachi Ikusei Bokujo

Year	No. of transfer	No. of pregnancy	Conception rate(%)
1981	12	5	41.6
1982	69	24	34.8
1983	141	55	39.0
1984	145	61	42.1
1985	267	161	60.3
1986	354	205	57.9
1987	322	205	63.7
Total	1310	716	54.7

Table 2. Conception rate when the corpus luteum (CL) was checked by one person or several persons (1981-1984)

Operator	No. of transfer	No. of pregnancy	Conception rate (%)
One person	199	97	48.7
Several persons	108	31	27.7

Table 3. Conception rate according to the time of transfer to the recipient (1985–1986)

Time of transfer (minute)	No. of transfer	No. of pregnancy	Conception rate(%)
Within 10	277	179	64.6
10~20	78	43	55.1
20~30	26	11	42.3
Over 30	22	6	27.3
Total	403	239	59.3

Table 4. Conception rate of frozen embryo transfer in Korea (1987–1988)

Recipient	No. of transfer	No. of pregnancy	Conception rate (%)
Heifer	29	21	74.4
Cow	15	6	40.0
Total	44	27	61.4

の受胎成績は、5年間で883頭中528頭で、受胎率は59.8%であった。十勝育成牧場における凍結卵（胚）の受胎率は、新鮮卵（胚）に比べ20%低いのが現状である。

韓国における凍結卵（胚）移植試験（日本で作成した牛凍結受精卵（胚）の試験的輸出）：1987年より1988年にかけて、日本において作成した凍結受精卵（胚）の移植試験を韓国において行う機会に恵まれたが、凍結卵（胚）であっても新鮮卵（胚）に勝るとも劣らない61.4%の高受胎率をあげることができた。とくに、未経産牛では、72.4%と驚異的な成績を示した（Table 4）。

凍結卵（胚）の処理方法は、十勝育成牧場で通常に行われている方法を用いた（凍結メディウムは50%準胎児血清加ダルベッコ PBS の1.4Mグリセリン液で1段階添加、凍結プログラムは10℃から－7℃まで1分間に1℃、－7℃から－30℃まで1分間に0.3℃の割合で下降させた、グリセリン除去は35℃の加温プレート下で5段階添加、移植液は30%準胎児血清加ダルベッコ PBS、移植器は0.25 ml の先穴式カスーガン）。ただし、十勝育成牧場で実用化している事業の供卵（胚）牛は能力や体型の優秀なホルスタイン種で、年間乳量20,000 kg を越えるスーパーカウも含まれているのに比べ、韓国向けの供卵（胚）牛は十勝育成牧場で飼養しているホルスタイン種の乳用未経産牛を用いた。

凍結卵（胚）作成にあたっては、北海道大学獣医学部家畜臨床繁殖学講座の適切な指導を受け、受卵（胚）牛の確保についてはソウル大学の家畜繁殖学教室のスタッフ（黄禹錫助教授がリーダー）が選定し、凍結卵（胚）の移植は十勝育成牧場のスタッフが行った。この三者のチームワークが最大限の効果をあげたものと推察される。好成績であった具体的な要因としては、第一に、Aランクの卵（胚）のみを凍結（試験用なのでBランク以下は破棄）したことがあげられる。第二の要因は受卵（胚）牛選定の際の選抜圧の高さが考えられる。ソウル大学のスタッフが83頭を選定していたが、さらに44頭を選抜した。第三に、移植者を熟練した技術者のみに限定した点があげられる。移植には十勝育成牧場の技術者の上位2名のみが対応した。

以上から、凍結卵（胚）であっても、良い卵（胚）、良い受卵（胚）牛、そして良い移植者の3条件がそろっていれば、新鮮卵（胚）と同様に高い受胎率の得られることが示された。

3）乳用牛を利用した黒毛和種の双子生産

富良野方式による双子生産：北海道富良野市のN牧場は、1986年3月より十勝育成牧場方式の受精卵（胚）移植を取り入れて黒毛和種の双子生産を行い、現在100頭以上の搾乳牛（ホルスタイン種）と50頭の繁殖和牛（黒毛和種）を飼養している複合経営農家である。数年前より兵庫県産の資質の高い黒毛和種の繁殖牛150頭を導入し、肥育用和牛を年間120頭出荷予定であった。しかし、資質が良好な群のなかにもバラツキがあり、かつ生産率も良好ではなかった。この現状を打破するために受精卵（胚）移植の技術が導入された。まず、150頭の繁殖和牛のうち「極上」「特選」が期待出来る資質のとくに優秀な牛50頭を選抜し、供卵（胚）牛とした。この供卵（胚）牛から過排卵処置により多数の卵（胚）を採取し、十勝育成牧場に飼養しているホルスタイン種の乳用育成牛に2卵（胚）移植を行った。黒毛和種の純粋種を受胎している乳用牛を年間80頭購入すると、双子率50%で120頭の優良牛の子牛が生産される。同じ120頭でも以前とは比べものにならない程資質が良いので、かなりの収入増が見込めることになる。

2卵（胚）移植の受胎成績と問題点：移植の作業上容易な片側子宮角への2卵（胚）移植方法と、両側の子宮角へ1卵（胚）ずつ計2卵（胚）移植する方法について、受胎率、流産率および双子率などの比較を行った（1986～1987）受胎率は、片側2卵（胚）移植が109頭中68頭

Table 5. Abortion rate according to the method of transfer (1986–1987)

Transfer method	No. of pregnancy	No. of abortion	Abortion rate(%)
Single uterine horn	68	14	20.6
Bicornual	59	5	8.5
Total	127	19	15.0

Table 6. Twinning rate according to the method of transfer (1986–1987)

Transfer method	No. of calving	No. of calf	Twinning rate(%)
Single uterine horn	54	84	55.6
Bicornual	52	80	53.8
Total	106	164	54.7

の62.4%に対し、両側2卵（胚）移植では85頭中59頭の69.4%とやや高い成績を示した。

受精卵（胚）移植による受胎牛は、通常の人工受精によるものと比較して流産率がやや高い傾向にあるが、片側2卵（胚）移植では、受胎数68頭中14頭と20.6%もの高い流産率を示した。これに比べ両側2卵（胚）移植では受胎数59頭中5頭のみで8.5%と低く（Table 5）、十勝育成牧場の乳用牛1卵（胚）移植の流産率に類似していた。

双子率については、106頭分娩し、164頭の子牛が誕生したことから54.7%で、移植方法による差はみられなかった（Table 6）。双子のうち雄雌の組合せは、58組中23組で39.7%もの高い確率であった。生時体重は、自然分娩の平均体重20 kg に対し、受精卵（胚）移植による分

娩は、双子の雌子牛に20 kg 以下のものもみられたが、ほとんど20 kg 以上であった。とくに単体で生まれた雌子牛の31 kg および雄子牛の35 kg は通常の但馬牛では考えられない体重である。

分娩は非常に安産で後産停滞も皆無であったが、逆に安産すぎて事故につながるケースもみられた。分娩に要する時間が非常に短いため、N牧場では防犯カメラなどを牛舎内に設置し、分娩の監視を行っている。

以上のことから、黒毛和種の双子生産を目的として2卵（胚）移植を行う場合には、流産率を低下させる意味において、子宮の両側に1卵（胚）ずつ移植を行うべきであろうと考えられた。また今回は、供卵（胚）牛として兵庫県産の黒毛和種を用いたが、他の大型の和牛の場合には双子生産が逆にマイナス効果となることも考えられるので慎重な対応が望まれる。

謝 辞

本研究の御指導と斉藤賞の御推薦ならびに本論文の御校閲をいただいた北海道大学金川弘司教授に深甚の謝意を表します。

文 献

- Kanagawa H (1980) Technology and application of embryo transfer in bovine. *J Jpn Vet Assoc* 33: 367–372 (in Japanese).
- Suzuki T, Shimohira I, Sakai Y, Matsuda S, Miura H, Itoh K (1986) Twinning in bovine by ipsilateral embryo transfer. *Jpn J Anim Reprod* 33: 44–47 (in Japanese).
- Yamashina H (1984) Problems and pregnancy rate of embryos transferred via the cervix in bovine. *Tech for Anim Reprod* 134: 46–49 (in Japanese).
- Yamashina H (1989) Trial export of frozen embryos from Japan to Korea. *ET Newsletter* 5: 47–57 (in Japanese).

要 約

北海道農業開発公社十勝育成牧場では、1981年より1987年までの7年間に1,310頭に移植を行い716頭の受胎例を得ている（受胎率54.7%）。1981年からの4年間は受胎率39.5%と低率であったので、受胎率の向上を目的として種々のデータの分析を行い重要なポイントが解明された。すなわち、受卵（胚）牛の黄体確認は1人が素早く行う事、移植に要する時間が増加するに従って受胎率が低下する事、技術者の技術や経験の差によって受胎率にバラツキが見られる事などである。これらの検討により1985年からの3年間の受胎率は60.6%と向上した。

ホルスタイン種乳用牛の凍結卵（胚）の受胎率は40%と低率であったが、1987年および1988年に行った韓国への試験的輸出における凍結卵（胚）の移植試験においては、受精卵（胚）、受卵（胚）牛および技術者を厳しく選定した結果、受胎率は61.4%と極めて良好であった。

1986年より黒毛和種の2卵（胚）をホルスタイン種乳用牛に移植する試験を行ったが、受胎率は65.5%と高率であった。双子率は50%で移植方法による差は見られなかったが、流産率においては、片側2卵（胚）移植の20%に対し、両側2卵（胚）移植では8%と低率であった。